

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL ESMALTE DENTARIO DESDE UNA PERSPECTIVA ANTROPOLÓGICA. TÉCNICA DE CORTE DELGADO PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

Selene Petrone¹ y Gonzalo Garizoain²

RESUMEN

Para describir y cuantificar las estructuras del esmalte a nivel histológico, la técnica que ha mostrado mejores resultados es la obtención de cortes delgados para microscopía óptica de transmisión. En este trabajo se analizan las características microestructurales de cortes delgados de tres piezas dentarias deciduas de exfoliación, obtenidos a partir de un protocolo estándar utilizado en mineralogía para el trabajo con materiales duros. Aunque el procedimiento permitió la obtención de corte delgado y la consiguiente identificación de ciertas estructuras de crecimiento, no posibilitó el relevamiento de aquellas que sólo son visibles a mayores aumentos. Creemos que mediante una correcta selección y registro de las piezas dentarias destinadas a este tipo de análisis, y mediante la aplicación de un protocolo de trabajo adaptado tanto a las muestras como al equipamiento disponible, la información que brindan estos estudios complementa la obtenida por métodos macroscópicos y permite reconstruir con mayor precisión la historia de desarrollo de las piezas dentarias.

PALABRAS CLAVE: Dentición decidua, marcadores microestructurales, protocolo estándar.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la morfología y desarrollo de los dientes brinda información sobre aspectos biológicos y culturales de las poblaciones humanas pasadas y presentes (Hillson 2005). El abordaje microscópico de las piezas dentarias permite aproximarse al crecimiento y desarrollo de los individuos contemplando variables fundamentales como la edad de inicio de mineralización de los tejidos, el tiempo total de formación de los mismos, y la edad de emergencia de las piezas dentarias, permitiendo la formulación de estándares que documentan y describen la variación existente en distintas poblaciones (Reid y Dean 2006; Risnes 1998). Al mismo tiempo, el aporte de la histología ha resultado de suma importancia en el estudio de la evolución de nuestra especie, a partir de la comparación del ritmo y el patrón de crecimiento de los tejidos dentarios y la erupción dentaria en homínidos tempranos y humanos modernos. Estos estudios

permitieron los cambios en el ciclo de vida de las distintas especies durante el proceso evolutivo, a partir de una correlación entre el proceso de formación dentaria y variables como la duración de la gestación, edad de destete, maduración sexual o esperanza de vida (Dean 1998, 2000; Fornai *et al.* 2014; Guatelli-Steinberg *et al.* 2012).

El esmalte es el tejido más duro del organismo debido a que estructuralmente está constituido por prismas de hidroxiapatita (fosfato de calcio) altamente mineralizados. Posee un porcentaje muy elevado de matriz inorgánica (95%) y muy bajo de matriz orgánica (1,2%). La estructura histológica del esmalte está constituida por la denominada unidad estructural básica (el prisma del esmalte) y por las llamadas unidades estructurales secundarias que se originan a partir de los anteriores como resultado del diferente grado de mineralización o del cambio de recorrido de los prismas (Gómez de Ferraris y Campos Muñoz 1999).

¹ Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. petroneselene@gmail.com

² Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. gonzagarizoain@gmail.com

La premisa que subyace a la utilización de técnicas histológicas para el estudio del proceso de formación dentaria es que, durante este proceso, la secreción de matriz está gobernada por ritmos metabólicos que regulan la tasa y/o la densidad mineral a través de un ciclo con una periodicidad recurrente que es la misma para todas las piezas dentarias de un individuo, y que tiene como correlato marcadores de tiempo microestructurales que se conservan en los productos de secreción (esmalte, dentina y cemento). Dado que la remodelación de los tejidos dentales es nula o mínima (en el caso de la dentina), estos marcadores de crecimiento se preservan de manera permanente en forma de bandas o estrías y pueden ser examinados e interpretados microscópicamente (Fitzgerald y Rose 2008). Los marcadores de crecimiento microestructurales del esmalte pueden agruparse en dos tipos: 1) Estrías de Crecimiento Diario, que son el resultado de los cambios metabólicos que surgen del ritmo circadiano (24 horas) y representan el crecimiento de los prismas del esmalte en un día; 2) Estrías de Retzius, que marcan la sucesiva aposición de capas de tejido durante la formación de la corona, y en humanos aparecen en el esmalte con una periodicidad que varía entre 6 y 11 días (Risnes 1998). Por otro lado existen marcadores denominados no incrementales que corresponden a eventos únicos de estrés producidos durante la formación de las coronas dentarias. Ejemplo de ellos son la línea neonatal producto del estrés que representa el cambio de ambiente con el nacimiento, períodos de nutrición inadecuada, trastornos endócrinos, virosis o infecciones. Debido a esto, los dientes pueden considerarse como un registro ideal para la evaluación retrospectiva del estado de salud de un individuo o población determinada (Gómez de Ferraris y Campos Muñoz 1999). En las últimas décadas, el abordaje microscópico de los tejidos dentarios ha brindado información muy valiosa referida al proceso de desarrollo, formación y crecimiento de los dientes debido a que los marcadores microestructurales permiten reconstruir la historia de formación de las piezas dentarias de un individuo (Hillson 2005; Risnes 1998). En este sentido, la precisión de las estimaciones de edad de muerte y la identificación de evidencias de estrés

a partir de la técnica histológica resultan aportes importantes para definir las características biológicas de las muestras esqueléticas y de esta manera aproximarnos a establecer perfiles de mortalidad y conocer aspectos demográficos de poblaciones pasadas y contemporáneas (Luna 2006).

Para describir y cuantificar la estructura del esmalte a nivel histológico, la técnica que ha mostrado mejores resultados es la obtención de corte delgado, aplicada al estudio de tejidos mineralizados tanto óseos como dentarios en distintas disciplinas (Crowder y Stout 2011; De Boer *et al.* 2011; Desántolo 2013; Mahoney 2012). Este tipo de análisis requiere un procedimiento estándar para la obtención de cortes que permita la correcta visualización de los marcadores de crecimiento (Caropreso *et al.* 2000; Fitzgerald y Rose 2008; Reid y Dean 2006). Los métodos más comúnmente utilizados para estimar tiempos de formación de corona se basan en la identificación de la línea neonatal y los prismas del esmalte a partir de los cuales se cuantifica el grosor del tejido desde la conexión amelo-dentinaria hasta la superficie externa del esmalte, realizando mediciones intermedias entre líneas acentuadas no incrementales (Birch y Dean 2014).

El objetivo de este trabajo es analizar las características de cortes delgados de esmalte dentario deciduo, obtenidos a partir de la implementación de un protocolo estándar utilizado en mineralogía para el trabajo con materiales duros. Se pretende evaluar la factibilidad de la observación de marcadores de crecimiento del esmalte al microscopio óptico de transmisión en distintos aumentos, e identificar las principales fuentes de error en la aplicación de este protocolo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

Se realizaron tres cortes histológicos de un primer molar inferior izquierdo, un segundo molar inferior derecho y un canino superior derecho deciduos de exfoliación (coronas completamente formadas), sin evidencia de intervenciones clínicas o patologías que afecten visiblemente la corona dentaria. Las piezas dentarias fueron cedidas por odontólogos particulares y no presentaron infor-

mación asociada de edad y sexo. Los preparados fueron realizados en el servicio de Petrotomía del Instituto de Recursos Minerales (INREMI, CIC-UNLP) siguiendo un protocolo estándar para la obtención de cortes delgados (De Boer *et al.* 2011; Reid *et al.* 1998). Se evaluaron las características microestructurales de los cortes histológicos al microscopio óptico.

Protocolo estándar

El protocolo implementado consta de los siguientes pasos:

- Limpieza: Las piezas dentarias se limpian mediante sonicado con agua destilada (máquina de ultrasonido Bandelin Sonorex TK 52) para quitar los restos de suciedad. Se deja secar la pieza a temperatura ambiente con el fin de quitar la humedad restante de las muestras antes de proceder a la inclusión.
- Inclusión: La resina se prepara en un recipiente plástico, se coloca por aproximadamente dos o tres minutos en un sistema de vacío para eliminar burbujas y luego se agrega endurecedor y se mezcla de forma lenta para evitar la formación de nuevas burbujas. Por último, se vierte en el molde de caucho donde se posiciona la pieza dentaria hasta cubrirla por completo. La resina utilizada para incluir la muestra dentaria en este caso fue una resina epoxi Araldit 2500 con endurecedor 659 B (CybaGeygy).
- Secado: Se deja secar el bloque de resina a temperatura ambiente o cerca de una fuente de calor externa (acelera el proceso de secado). Una vez finalizado el proceso de secado, se procede a realizar el primer corte de la muestra.
- Primer Corte: El corte del bloque de resina se realiza con una máquina Petro-Thim de Buehler, con un disco de borde diamantado de 2mm. Para ello es fundamental la orientación precisa de la pieza con el fin de obtener el plano deseado. El corte consiste en una sección longitudinal con un grosor de aproximadamente 500 micras.
- Desbaste: Es el proceso que se realiza luego del primer corte para homogeneizar y suavizar la superficie producto del corte. Se realiza de manera manual utilizando abrasivos de carburo de silicio (320-600) y óxido de aluminio 1200, hasta obtener la superficie deseada.
- Pulido: Se utilizan pastas diamantadas para el acabado de la superficie (elimina rastros del corte y desbaste). Las pastas son de tipo P de 6, 3 y 1/4 de micrómetro. El pulido se realiza de manera manual preferentemente vidrio sobre vidrio. La terminación de la cara ya pulida se realiza con alúmina de uso metalográfico de 0,1 micras. El proceso se realiza con un paño de pulido Microplan autoadhesivo de diámetro 8" (203 mm).
- Ultrasonido: Con el fin de remover los restos de los pasos anteriores, se somete la muestra a ultrasonido con agua destilada por cinco minutos aproximadamente y luego se seca sobre fuente de calor a 25-30°C para eliminar los restos de humedad.
- Montaje: La superficie terminada de la muestra se pega en el portaobjetos para proceder a realizar el segundo corte con el fin de obtener el grosor definitivo del preparado. Se utilizan vidrios biológicos Pearl para microscopía de 25,4x76,2 mm. Para lograr una mayor adherencia de la muestra al vidrio se realiza un esmerilado del mismo con óxido de aluminio 1200. Luego se limpia con acetona y se coloca como pegamento resina Araldit 5052 con endurecedor HI 5052. Se ubica la muestra sobre el vidrio y se hace presión para eliminar el espesor del pegamento y para evitar la formación de burbujas.
- Segundo Corte: Con el segundo corte se busca obtener el grosor final de la muestra (aproximadamente 150-200 micras). Se coloca el vidrio con la muestra en la máquina Petro-Thim y se procede a realizar el corte.
- Terminación: Se siguen los pasos citados anteriormente de desbaste y pulido a la otra cara del corte. Para la correcta observación de las estructuras al microscopio óptico es necesario que la superficie que se observa al microscopio esté lo más limpia y homogénea posible, sin rastros de marcas de corte o pulido.

Se realizó una sección longitudinal de cada diente, siguiendo el protocolo expuesto anteriormente, y las secciones histológicas fueron analiza-

das a través de microscopía óptica de transmisión. Se empleó un Fotomicroscopio Trinocular Nikon (Modelo Eclipse E200) con objetivo 10x y ocular 10x, equipado con cámara digital Nikon (Modelo Coolpix S10), perteneciente a la Cátedra de Citología, Histología y Embriología “A” de la Facultad de Ciencias Médicas.

Debido a que las muestras biológicas que se van a observar al microscopio requieren de algún tipo de procesamiento, durante la implementación de los protocolos específicos pueden aparecer errores conocidos como “artefactos”, que no son propios de la estructura del tejido y pueden llevar a confusiones y dificultades en la identificación y descripción del preparado. Ejemplo de artefactos de la técnica son las burbujas en la resina y las marcas producidas por el disco de corte (Portiansky 2013). De esta manera, en cada una de las secciones obtenidas se relevaron los marcadores microestructurales que fue posible identificar en distintos aumentos: estrías transversales diarias, estrías de Retzius regulares y estrías no incrementales (Línea Neonatal y demás estrías acentuadas) (Figura 1), y se registraron los artefactos de la técnica producto de errores surgidos de la aplicación de este protocolo a muestras dentarias.

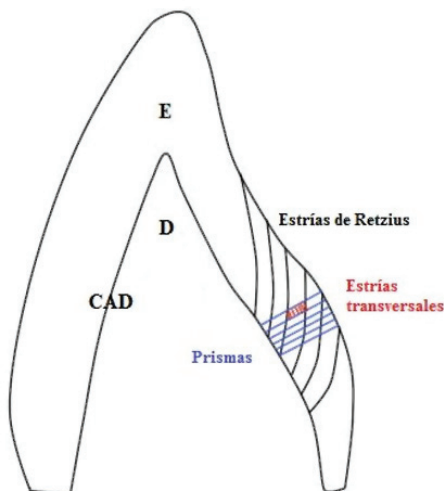


Figura 1. Gráfico de corte longitudinal de diente anterior donde se grafican las estructuras de crecimiento analizadas en este trabajo. E= esmalte; D= dentina; CAD= conexión amelo-dentinaria. Las líneas negras representan las estrías semanales o de Retzius que van desde la CAD hacia la superficie externa del esmalte; las líneas azules grafican el recorrido de los prismas del esmalte; y las líneas rojas las estrías transversales diarias que son el producto del crecimiento diario del esmalte.

RESULTADOS

En las Figuras 2, 3 y 4 se observan las imágenes de los cortes histológicos de las tres piezas dentarias analizadas. En cada caso, las regiones seleccionadas para la toma de imágenes se determinaron a partir de la posibilidad de visualizar marcadores de crecimiento; por otro lado, en aquellos casos en los cuales no fue posible la visualización de estos marcadores microestructurales, se seleccionaron aquellas regiones del corte histológico donde quedó de manifiesto el artefacto de la técnica que no permitió la correcta identificación de las estrías.

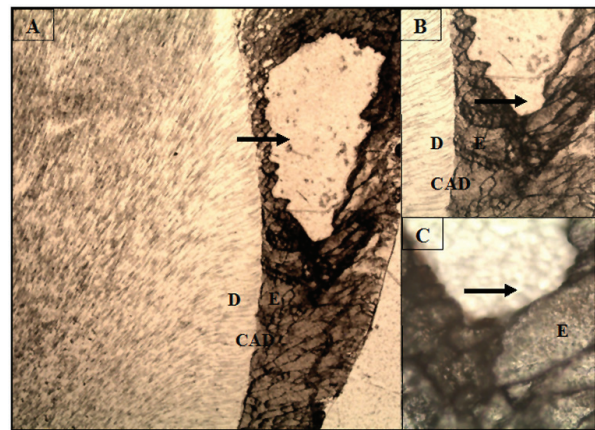


Figura 2. Corte histológico de primer molar inferior izquierdo decíduo de exfoliación al microscopio óptico de transmisión. E= esmalte; D= dentina; CAD= conexión amelo-dentinaria. A) Región medial a un aumento de 4x; B) Región medial a un aumento de 10x; C) Región medial a un aumento de 40x. Las flechas indican la desaparición del esmalte por exceso de pulido.

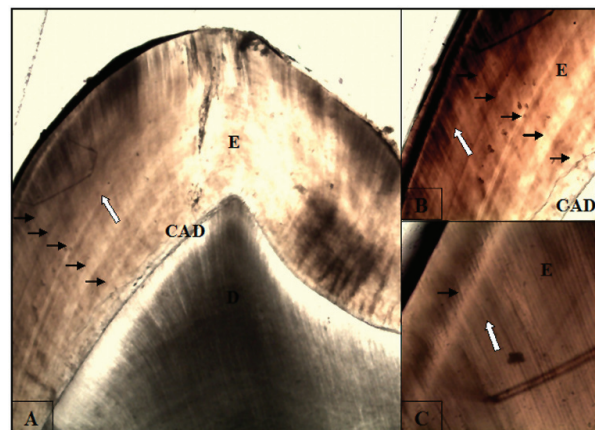


Figura 3. Corte histológico longitudinal de segundo molar inferior derecho decíduo de exfoliación al microscopio óptico de transmisión. E= esmalte; D= dentina; CAD= conexión amelo-dentinaria. A) Región oclusal a un aumento de 4x; B) Región oclusal a un aumento de 10x; C) Región oclusal a un aumento de 40x. Las flechas negras señalan las estrías de Retzius como bandas claras y las flechas blancas, la dirección de los prismas del esmalte.

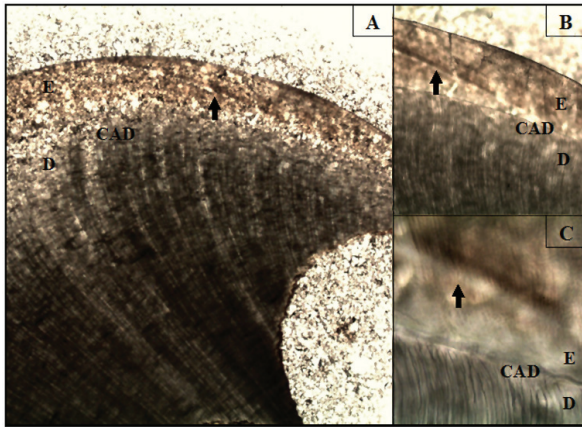


Figura 4. Corte histológico longitudinal de canino superior derecho deciduo de exfoliación al microscopio óptico de transmisión. E= esmalte; D= dentina; CAD= conexión amelo-dentinaria. A) Región cervical a un aumento de 4x; B) Región cervical a un aumento de 10x; C) Región cervical a un aumento de 40x. Las flechas negras señalan una estría acentuada que podría corresponderse con la línea neonatal.

La Figura 2 comprende tres imágenes en distintos aumentos de la microestructura de la región medial de un primer molar inferior deciduo izquierdo de exfoliación. En las imágenes A, B y C, que presentan un aumento de 4x, 10x y 40x respectivamente, se observan el esmalte y la dentina unidos por la conexión amelo-dentinaria, presentando la microestructura de estos tejidos un aspecto que no se corresponde con el esperado. El preparado presentó un espesor de 60 micrómetros (0,06 mm), siendo más delgado de lo que se requiere para la observación de las estructuras dentarias con un exceso de pulido en la totalidad de la superficie, lo que se evidencia en la desaparición del esmalte en ciertas regiones del preparado, como se indica en la fotografía. Por otro lado, la microestructura característica del esmalte no se aprecia debido a las fracturas del mismo, no pudiendo identificarse prismas, estrías transversales diarias ni estrías de Retzius. En la fotografía C se puede observar que por errores en el procedimiento citados anteriormente, relacionados principalmente con las etapas de corte y pulido, fue imposible obtener una imagen en foco. Por lo tanto, el corte histológico del primer molar deciduo no permitió la identificación de estructuras de crecimiento en ninguno de los aumentos observados. La Figura 3 incluye tres fotografías de la región oclusal de la corona de un segundo molar inferior

derecho deciduo de exfoliación. En las imágenes A, B y C se pueden observar las estrías de Retzius de distintos grosores (bandas claras) indicadas con flechas negras, que atraviesan la superficie del esmalte de manera que interrumpen el recorrido de los prismas (señalado por las flechas blancas). Estas estrías incluyen líneas incrementales y no incrementales, pudiendo representar la más cercana a la conexión amelo-dentinaria (CAD), la Línea Neonatal, que coincide con el evento del nacimiento y generalmente es la primera banda que aparece en el esmalte después de la CAD. Las características de este preparado, fundamentalmente el grosor del mismo (200 micrómetros, que equivalen a 0,2 mm) permitieron la identificación ciertos marcadores de crecimiento del esmalte, aunque las estrías transversales que deberían observarse en el recorrido de los prismas no son visibles. Esto podría deberse a problemas relacionados con el grosor o con el plano de corte, lo que tiene como consecuencia la falta de visibilidad del bandeo típico producto del crecimiento diario de los prismas, desde la conexión amelo dentinaria hacia la superficie externa del esmalte.

Por último, la Figura 4 representa el corte longitudinal de un canino superior derecho deciduo de exfoliación. El grosor final del corte fue de 130 micrómetros (0,13 mm), el cual, a pesar de aproximarse al grosor ideal buscado, presentó dificultades para la identificación de la microestructura del esmalte. En ninguna de las imágenes (A, B y C) pudieron ser individualizados prismas ni estrías transversales diarias. Tampoco se observan marcadores de largo plazo, caracterizados por el típico bandeo que aparece en la Figura 3. La única estructura que se identificó es la que podría considerarse como Línea Neonatal y divide el esmalte prenatal del postnatal. Al observar el aspecto entre las dos áreas de esmalte divididas por esta estría, queda de manifiesto que existen diferencias, sobre todo en la coloración y en la microestructura, aunque la caracterización de la misma se vio dificultada principalmente por el exceso de pulido que dañó la superficie del esmalte.

DISCUSION

El crecimiento incremental característico del esmalte dentario representa un registro que asociado

a una escala temporal, es una herramienta fundamental para determinar la tasa de depositación del esmalte, el tiempo de formación de la corona dentaria y el momento en el que sucedieron ciertos eventos de estrés durante el crecimiento.

La identificación de la Línea Neonatal, estrías diarias y semanales en piezas dentarias en desarrollo permite establecer el tiempo de gestación, determinar si un individuo nació vivo y eventualmente calcular con precisión el tiempo de supervivencia a partir de la cuantificación de estos micromarcadores del esmalte prenatal y postnatal, lo que resultó un aporte valioso en la discusión sobre mortalidad infantil y prácticas de infanticidio y sacrificio en bioarqueología y paleodemografía (Zanolli *et al.* 2011).

La técnica histológica ha sido aplicada sobre piezas dentarias provenientes de colecciones osteológicas, especialmente sobre dientes actuales de casos clínicos generalmente con registro médico asociado, cuya importancia radica en la posibilidad de contrastar la información biológica obtenida a partir de la cuantificación de la microestructura dentaria con información cronológica. En este contexto, los trabajos realizados sobre dientes deciduos de exfoliación representan un aporte valioso, debido a que permiten reconstruir con precisión los tiempos de formación de las coronas dentarias para cada tipo de diente, y utilizar estos datos para la interpretación de muestras arqueológicas y forenses sin registros médicos o documentales asociados (Birch y Dean 2014; Hillson 2005; Reid y Dean 2006; Risnes 1998).

El trabajo con piezas dentarias representa un caso particular en el campo de la histología debido a que se trata de material biológico con una gran dureza producto de la mineralización de sus tejidos, por lo que el abordaje microscópico del esmalte requiere un procedimiento estandarizado que permita la correcta visualización y cuantificación de los marcadores de crecimiento. La técnica de corte delgado para microscopía óptica de transmisión es la aproximación más adecuada, pero existen dificultades relacionadas con las características propias de las muestras (principalmente estadio de desarrollo e integridad de las piezas dentarias), el equipamiento disponible y la implementación de

los protocolos en cada caso (Antoine *et al.* 2009; Caropreso *et al.* 2000).

Estudios histológicos de los tejidos dentarios se realizan sistemáticamente desde la década del ochenta, aunque esta práctica haya sido resistida en ocasiones debido a la idea de que su aplicación implica la destrucción del material, y que requiere de mucho tiempo y esfuerzo. Creemos que mediante una correcta selección y registro de las muestras destinadas a este tipo de análisis, y la aplicación sistemática de un protocolo de trabajo adaptado a las muestras y al equipamiento disponible, la información que brindan estos estudios complementa la obtenida por métodos macroscópicos, dado que conduce a estimaciones confiables, con una mayor precisión temporal (en escala de semanas y meses) de los eventos ocurridos durante la formación dentaria, en el marco del proceso global de crecimiento y desarrollo de un individuo.

En los últimos años se ha problematizado la implementación de protocolos de trabajo, haciendo foco en la importancia de detallar los pasos, materiales, equipamiento utilizado y los consiguientes resultados obtenidos, con el fin de lograr la replicabilidad y la comparación de los mismos (De Boer *et al.* 2011; Luna 2016). En este sentido Marks *et al.* (1996) plantean el problema de la confusión metodológica existente en distintas áreas del conocimiento, que impide la utilización del abordaje histológico para generar información valiosa, sobre todo en estudios comparativos. Esto incluye la selección de muestras para análisis microestructurales, identificación de defectos del desarrollo en los tejidos, y sobre todo, protocolos aplicables para la preparación de cortes delgados para microscopía óptica.

Asimismo, se han comenzado a explorar posibilidades de trabajo con otro tipo de materiales, más allá de los tradicionalmente utilizados, que provienen de diversas áreas de investigación; ejemplo de ello es el trabajo de Caropreso *et al.* (2000), que utiliza insumos odontológicos de fácil accesibilidad y manipulación (resinas y adhesivos de foto-curado) para la preparación de cortes delgados de tejidos duros. Estas alternativas no sólo presentan ventajas en cuanto a la disminución del tiempo y de los pasos necesarios para obtener los cortes sino que constituyen mejoras significativas

en la calidad de los mismos. En este sentido los autores expresan, *“New techniques have been proposed recently for light and backscattered electron microscopy, which allow an improved and rapid preparation of specimens and, moreover, enhance the adhesion of the sample to the glass-slide. Our method, independently developed for transmitted light microscopy, offers improvement of the quality of thin sections and substantial ‘contraction’ of the number of the steps and time needed to prepare specimens for histological analysis”* (Caropreso *et al.* 2000:244).

El protocolo puesto a prueba en este trabajo es el utilizado para la preparación de materiales geológicos, que presentan similitudes, sobre todo en cuanto a su dureza, con las muestras dentarias. Aunque el procedimiento permitió la obtención de un corte delgado y la consiguiente identificación de ciertas estructuras de crecimiento, no posibilitó el relevamiento de las estrías diarias, visibles generalmente a mayores aumentos. Esta situación se relaciona principalmente con dificultades en la obtención del grosor específico necesario y a la presencia de fracturas en el esmalte, producidas probablemente por el impacto del disco sobre el tejido durante el proceso de corte. Idealmente, para la preparación histológica de material dentario se utilizan máquinas de corte de baja velocidad para evitar que el impacto deteriore las muestras, con la desventaja de que la adquisición de este equipamiento resulta muy costosa, por lo cual muchos de los laboratorios que trabajan con tejidos mineralizados carecen del mismo (Marks *et al.* 1996).

Por otro lado, cuando la escala de trabajo es en el orden de los micrómetros, como sucede en el campo de la histología, cualquier variación, por pequeña que sea, puede resultar en la imposibilidad de identificar las estructuras buscadas. En este sentido es de suma importancia el proceso de control durante la implementación de los protocolos de trabajo, por lo que sería ideal que el procedimiento sea llevado a cabo por el mismo investigador/profesional con conocimiento de las estructuras biológicas que se busca analizar, tanto en el plano macroscópico de su anatomía como a nivel microscópico, en relación con las posibilidades de observación en distintos planos.

Es por ello que creemos esencial la explicitación de protocolos, materiales y equipamiento utilizados, con el fin de problematizar la elección de técnicas de trabajo, según las características de las muestras y la tecnología disponible en cada caso. Así también, es importante explorar las posibilidades de trabajo, no sólo de los insumos y equipamiento tradicionales sino también de otras tecnologías que parecen conducir a buenos resultados, con menores costos de dinero y tiempo.

CONCLUSIONES

La formación de los dientes representa un registro fundamental del crecimiento y desarrollo de poblaciones presentes y pasadas a partir de marcadores microestructurales que se preservan en esmalte, dentina y cemento, y pueden ser examinados microscópicamente a partir de la obtención de secciones longitudinales de las piezas dentarias. Para ello, es necesaria la implementación de técnicas de trabajo que posibiliten la identificación e interpretación de marcadores de crecimiento, y permitan reconstruir procesos que actuaron durante su formación. En este trabajo se aplicó el protocolo utilizado para la observación microscópica de muestras geológicas, a muestras dentarias. Los resultados obtenidos sugieren que más allá de la posibilidad de identificar ciertas estructuras de crecimiento, el procedimiento debe adaptarse a las características particulares de las piezas dentarias, haciendo especial énfasis en el control sistemático necesario durante todo el proceso, con el fin de que la microestructura del esmalte sea reconocible en todos los aumentos.

Es en este contexto que la explicitación de protocolos de trabajo empleados por los investigadores, con sus aciertos y errores, y la exploración de nuevos materiales de fácil acceso, juegan un papel fundamental en el avance del conocimiento en Antropología y otras ciencias afines, permitiendo formular estándares confiables que documenten la variación existente en el proceso de desarrollo y formación dentaria.

AGRADECIMIENTOS

A José Luis Molina por su dedicación en la obtención de los preparados. A todos los integrantes

del Proyecto “Análisis macro y microscópico de restos óseos humanos. Aportes a la investigación forense y antropológica”. Al Dr. Leandro Luna cuyas observaciones sirvieron para enriquecer este trabajo. A la Universidad Nacional de La Plata por el otorgamiento de becas de investigación y subsidios que permitieron la realización del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

ANTOINE, D., S. HILLSON y M. C. DEAN

2009. The developmental clock of dental enamel: a test for the periodicity of prism cross-striations in modern humans and an evaluation of the most likely sources of error in histological studies of this kind. *Journal of Anatomy* 214: 45-55.

BIRCH, W. y M. C. DEAN

2014. A method of calculating human deciduous crown formation times and of estimating the chronological ages of stressful events occurring during deciduous enamel formation. *Journal of Forensic and Legal Medicine* 22: 127-144.

CAROPRESO, S., L. BONDIOLI, D. CAMPANNOLO, L. CERRONI, R. MACCHIARELLI y S. G. CONDO

2000. Thin sections for hard tissue histology: a new procedure. *Journal of Microscopy* 199(3): 244-247.

CROWDER, M. C. y S. STOUT

2011. *Bone Histology. An Anthropological perspective*. CRC Press, Nueva York.

DEAN, M. C.

1998. A comparative study of cross striation spacings in cuspal enamel and of four methods of estimating the time taken to grow molar cuspal enamel in Pan, Pongo and Homo. *Journal of Human Evolution* 35: 449-462.

2000. Progress in understanding hominoid dental development. *Journal of Anatomy* 197: 77-101.

DE BOER, H. H., M. J. AARENTS y G. J. MAAT

2011. Manual for the preparation and staining

of embedded natural dry bone tissue sections for microscopy. *International Journal of Osteoarchaeology* 23(1): 83-83.

DESÁNTOLO, B.

2013. *Validación metodológica para la estimación de edad en restos óseos humanos adultos: análisis histomorfométrico*. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata. Ms.

FITZGERALD, C. M. y J. C. ROSE

2008. Reading between the lines: dental development and subadult age assessment using the microstructural growth markers of teeth. En *Biological anthropology of the human skeleton*, editado por M. A. Katzeberg y S. Saunders, pp. 237-263. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.

FORNAI, C., S. BENAZZI, J. SVOBODA, I. PAP, K. HARVATI y G. H. WEBER

2014. Enamel thickness variation of deciduous first and second upper molars in modern humans and Neanderthals. *Journal of Human Evolution* 76: 83-91.

GÓMEZ DE FERRARIS, M. E. y A. CAMPOS MUÑOZ

1999. *Histología y Embriología Bucodental*. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España.

GUATELLI-STEINBERG, D., B. A. FLOYD, M. C. DEAN y D. J. REID

2012. Enamel extension rate patterns in modern human teeth: Two approaches designed to establish an integrated comparative context for fossil primates. *Journal of Human Evolution* 63: 475-486.

HILLSON, S.

2005. *Teeth*. Segunda edición. Cambridge University Press, Cambridge.

LUNA, L. H.

2006. Alcances y limitaciones del concepto de estrés en bioarqueología. *Antípoda* 3: 255-279.

2016. Some Achievements and Challenges of Dental Anthropology. *ARC Journal of Dental Science* 1(1): 5-9.
- MAHONEY, P.
2012. Incremental enamel development in modern human deciduous anterior teeth. *American Journal of Physical Anthropology* 147: 637-651.
- MARKS, M. K., J. C. ROSE y W. D. DAVENPORT
1996. Technical Note: Thin Section Procedure for Enamel Histology. *American Journal of Physical Anthropology* 99: 493-498.
- PORTIANSKY, E. L.
2013. *Análisis multidimensional de imágenes digitales*. Primera edición. Universidad Nacional de La Plata.
- REID, D.J., A.D. BEYNON y F. V. RAMIREZ ROZZI
1998. Histological reconstruction of dental development in four individuals from a medieval site in Picardie, France. *Journal of Human Evolution* 35: 463-477.
- REID, D. J. y M. C. DEAN
2006. Variation in modern human enamel formation times. *Journal of Human Evolution* 50: 329-346.
- RISNES, S.
1998. Growth tracks in dental enamel. *Journal of Human Evolution* 35: 331-350.
- ZANOLLI, C., L. BONDIOLI, F. MANNI, P. ROSSI y R. MACCHIARELLI
2011. Gestation length, mode of delivery and neonatal line thickness variation. *Human Biology* 83(6).